

# 不妊症男性精子におけるインプリント遺伝子のDNA メチル化異常とその検出法の開発

著者	佐藤 晶子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第15444号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/58429">http://hdl.handle.net/10097/58429</a>

博士論文

不妊症男性精子におけるインプリント遺伝子の  
DNA メチル化異常とその検出法の開発

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻  
発生・発達医学講座 周産期医学分野  
佐藤 晶子

## 目 次

要 約.....	1
研究の背景.....	4
研究目的.....	9
研究方法.....	10
研究結果.....	18
考 察.....	27
結 論.....	36
謝 辞.....	37
参考文献.....	38
図 表.....	43
略 記.....	54
図の説明.....	55
添付資料.....	59

## <要 約>

### 【研究の背景】

近年の生殖補助医療（ART）の進歩は目覚ましく、一般的な不妊治療として定着している。しかし、ART の普及により、ART 後の出生児（ART 出生児）に、これまで非常に稀であった先天性ゲノムインプリンティング異常症の発症頻度が増加していることが、世界中で報告され話題となっている。このゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、生殖細胞（配偶子）形成過程で、母（卵子）由来と父（精子）由来のゲノムの特定領域に、DNA メチル化を確立することで親由来の区別を行う仕組みである。つまり、インプリントが確立する時期の配偶子は、環境変化に対して非常に脆弱でかつ不安定であると考えられ、かつその時期に ART により配偶子を操作する事が、様々な異常を招く可能性があると言われている。しかし一方で、不妊症患者自身の配偶子（精子あるいは卵子）にメチル化異常が存在する可能性も考えられる。そこで、本研究では、不妊症男性精子のメチル化インプリント異常の頻度、程度、

影響を受ける遺伝子について解析した。

#### 【研究目的】

本研究では、不妊症男性精子におけるインプリント遺伝子のメチル化異常の頻度や影響を受けやすい遺伝子領域について解析し、その特徴について明らかにすること、および臨床現場に応用するため、迅速かつ簡便な DNA メチル化診断法（PCR-Luminex 法）を開発する事を目的とした。

#### 【研究方法】

男性精子 197 例（うち乏精子症患者精子 65 例）より DNA を抽出し、22 領域のインプリント遺伝子のアレルト異的メチル化領域について COBRA 法、シーケンス法を用いて、メチル化の解析をおこなった。また、新規 DNA メチル化解析システム（PCR-Luminex 法）の試作とその性能評価について、従来法と比較検討した。

#### 【研究結果】

22 領域のメチル化インプリントの解析では、25.4%（50/197）にメチル化異常を認

めた。その内訳は、精子型インプリント異常 18%、卵子型インプリント異常 82%であった。また、重症型乏精子症患者精子では高率（74.1%（20/27））にメチル化異常がみられた。このメチル化異常の頻度は、精子数、精子運動率と負の相関を示し、精子奇形率とは正の相関を示した。8 領域のインプリント DMR において、PCR-Luminex 法を用いたメチル化解析の測定値は、従来法の測定値と比較検定し、1 領域（GTL2）を除き有意な相関を示した。

#### 【考察および結論】

不妊症男性精子では、およそ 25%にメチル化インプリントの異常が認められた。また、このメチル化異常の頻度と程度は、精液所見には強い関連がみられた。この事実より、精子形成とメチル化異常に関連があることが示唆された。また、新規 DNA メチル化診断法として PCR-Luminex 法は、より良好な精子の選別を行う方法として、臨床に有用であることが確かめられた。

## ＜研究の背景＞

最近、我が国の晩婚化、少子化の社会情勢と生殖医療技術の進歩により、体外受精（IVF：In vitro fertilization）や顕微授精（ICSI：Intracytoplasmic sperm injection）など生殖補助医療（ART：Assisted reproductive technologies）は、一般的な不妊治療として定着している。しかしこの ART の普及と、先天異常、低出生体重、周産期合併症の増加との関連性が指摘されている<sup>1-3)</sup>。また ART 出生児では、本来非常に稀であったインプリント異常を原因とする先天性インプリント異常症（Beckwith-Wiedemann 症候群：BWS（NIM130650）、Angelman 症候群：AS（NIM105830））の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられる（添付資料 図 1）。インプリント異常は、先天性疾患だけでなく、周産期異常、乳幼児の身体的、精神的発育・発達、性格、行動異常等にも関連する<sup>4)</sup>。また、癌や生活習慣病などの成人性疾患の原因にもなりうるため、将来の国民の健康衛生上、重要な問題である。

ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないユニークな遺伝子発現様式を示す現象で、哺乳類の胎児の正常な発生、胎盤機能あるいは神経の発達等に重要な役割を果たす<sup>5,6)</sup>。このゲノムインプリントを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）は、2本ある対立遺伝子（アレル）がそれぞれ母由来か、または父由来かを識別し、特定の親由来のアレルの発現（片親性発現）を示す（添付資料 図2）。この遺伝子発現調節には、アレル特異的な DNA メチル化が必須であることが、マウスを使ったこれまでの研究で明らかとなっている<sup>7,8)</sup>。このような領域は、DMR（Differentially methylated regions）と呼ばれている。この DMR のメチル化は、始生殖細胞（Primordial germ cells: PGC, 精子、卵子の元になる細胞）で消去され、配偶子形成過程では、精子型または卵子型のインプリント（メチル化インプリント）が確立する（精子では精子型インプリント、卵子では卵子型インプリント）。卵子型インプリントは未熟卵から成熟卵にかけて確立し、遺伝子ごとに原始卵胞期から胞状卵胞期の間に、メチル化獲得の時期が異なっ



ている（添付資料 図 3 右）。

一方、精子形成過程でメチル化を獲得する精子型インプリントは、これまでに 4 つの DMR（H19、Gtl2、Rasgrf1、Zdbf2）が報告されている（添付資料 図 3 左）。また、ヒトでは RASGRF1 を除く 3 種類のインプリント遺伝子が報告されている。マウス雄の生殖細胞の詳細な解析により、4 つの遺伝子の DMR は、いずれも有糸分裂期にある前精原細胞でメチル化が確立することが報告されている<sup>9-12,42)</sup>。また、確立した卵型および精子型のメチル化インプリントは、受精後の着床初期にみられるリプログラミング（ゲノム全体の脱メチル化）の影響を受けることなく、体細胞として安定に維持される<sup>13)</sup>。つまり、受精以前に、精子では精子型インプリントが、卵子では卵型インプリントがメチル化を獲得し、受精後は、体細胞として両方のインプリントを保持する。また、これらのインプリント遺伝子のメチル化の異常は、様々な疾患や児の発育、発達異常、悪性腫瘍とも関連することも数多くの報告がある<sup>4)</sup>。

配偶子および初期胚は、DNA メチル化などのエピジェネティックな修飾が、ダイナミックに変動する時期である<sup>14,15)</sup>。ART は、この時期に非常に脆弱な配偶子および初期胚を操作するため、これら細胞のエピジェネティクスに影響を及ぼす可能性が十分ある。一方で、不妊症患者自体の配偶子の問題も考えられる。特に不妊症の原因のおよそ半数は男性因子（精子に原因がある）であり、近年増加傾向にあることが報告されている（平成 20 年日本産婦人科学会不妊登録）。また、精子数が少ない乏精子症では、環境やストレスなどが原因となることも報告されており<sup>16-19)</sup>、乏精子症の精子では、エピジェネティックな異常を有することが予想される。

ヒト精子のメチル化インプリントについては、これまでに報告が少ない。正常なヒト精子では、減数分裂に入る以前に SNRPN（卵子型インプリント）のメチル化が消去され<sup>20)</sup>、H19（精子型インプリント）のメチル化が獲得されると報告されている<sup>21,22)</sup>。

Marques らは、乏精子症の患者と少数であるが正常形態を示す精子にも、インプリント遺伝子 H19 にメチル化異常がある事を報告している<sup>19)</sup>。一方で、不妊症男性の精

子では、インプリント遺伝子のメチル化が全て正常であったとの報告もある<sup>23)</sup>。いずれにしても、これらの報告は限られたインプリント遺伝子の解析にすぎず、ヒト精子のゲノムインプリンティングに関する詳細な研究は、ほとんど行われていない。

そこで、本研究では、多数例の男性精子を対象に、インプリント遺伝子の DNA メチル化について解析し、異常の頻度、程度、影響を受けやすい領域について明らかにした。また、簡便な DNA メチル化診断法として、PCR-Luminex 法を応用し、その性能評価を従来法と比較した。

## ＜研究目的＞

### (1) ヒト不妊症男性精子におけるメチル化インプリントの異常について

多数例の男性精子におけるインプリント異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子について解析する。また、精子のインプリント異常を示す症例の特徴について検討する。

### (2) 新規 DNA メチル化診断法の開発

臨床現場への実践的導入を目指し、PCR-Luminex 法を応用し、8 つのインプリント領域の異常を判定する診断システムを構築、世界初のオンリーワン精子検査法として、従来法との比較検討を行う。

## ＜研究方法＞

### 1. 精子サンプルの収集

不妊治療専門病院を受診し、形態学的な精液検査（量、精子濃度、運動率、奇形率）を受けた男性に、本研究の説明を行い、同意が得られた男性 197 名を対象にした。また、内分泌疾患などの基礎疾患のある患者や同意の得られなかった患者は、除外した。

精子は、精液検査後の、本来廃棄される精子細胞を用い、本研究に使用した。収集した精子は、スイムアップ法<sup>24)</sup>により、リンパ球、上皮細胞を除去した。精液検査では、197 例のうち、132 例は「正常精子」を示した。残りの 65 例の患者は、「乏精子症」で「中等度乏精子症」は 38 例、「重度乏精子症」は 27 例であった。精子細胞は Phosphate buffered saline (PBS) 液で繰り返し洗浄し、0.1mM 2-メルカプトエタノール<sup>25)</sup>を用いた標準的抽出方法により DNA を抽出した。体細胞としてヒト正常末梢血白血球 DNA は、使用した。精子濃度の分類は、「正常精子」は、 $20 \times 10^6$  /ml 以上、「中等度乏精子症」は、 $20 \sim 5 \times 10^6$  /ml、「重度乏精子症」は、 $5 \times 10^6$  /ml 未満とした。

不妊期間が長い、あるいは繰り返し流産の既往がある場合、本人の希望などで、末梢血を用い染色体検査を 40 例行った。

## 2. DNA メチル化の解析

DNA メチル化の解析は、COBRA 法 (Combined bisulphite PCR restriction analysis) とバイサルファイトシーケンス法<sup>12)</sup>を併用した。(添付資料 図 4) 22 領域のヒトインプリント遺伝子 (H19、GTL2、ZDBF2、DIRAS3、NAP1L5、FAM50B、ZAC (PLAGL1)、GRB10、PEG10、PEG1 (MEST)、INPP5F-v2、LIT1 (KCNQ1OT1)、RB1、SNRPN、ZNF597、ZNF331、PEG3、PSIMCT-1、NNAT、L3MBTL、NESPAS、GNAS1A) の DMR について、DNA メチル化の解析をおこなった。まず、精子 DNA は、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) を用い、バイサルファイト処理をおこなった。バイサルファイト処理により、メチル化していないシトシンは、ウラシルへ変換するのに対し、メチル化したシトシンは、メチルシトシンのまま残る。バイサルファイト処理後、22 領域の

インプリント DMR を、以下の条件で PCR (Polymerase chain reaction) にて増幅した。

PCR 反応液は、各 0.5 $\mu$ M プライマー、200 $\mu$ M dNTPs、1x PCR Buffer、1.25U の EX Taq

Hot Start DNA Polymerase (TaKaRa Bio)、20 $\mu$ l スケールに調整した。PCR の反応条件

は、初期変性 96°C 30 秒 (1 回)、各遺伝子に対応したアニーリング温度(57~60°C)で

30 秒、72°C 30 秒 (30 回)、さらに伸長反応 72°C 30 秒 (1 回) をおこなった。各遺

伝子 DMR の遺伝子マップを、**図 1** に記した。また、各遺伝子 DMR のプライマー情報

は**表 1** にまとめた。

## (1) COBRA 法

COBRA 法では、メチル化しているテンプレート DNA (バイサルファイト処理済

み) は、PCR 後に制限酵素を用いて切断できる。鋳型 DNA 4  $\mu$ l、制限酵素 1  $\mu$ l、

制限酵素 10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ l、蒸留水 4  $\mu$ l、合計 10  $\mu$ l とし、37°C、8 時間反応させた。

各 DMR の PCR 産物に用いた制限酵素を**表 1** に示した。各断片長の DNA 量は

Lumiimager analyzer と Lumianalyst ソフトウェアパッケージ (Roche Diagnostics) で定量化し、制限酵素で切断された PCR 産物量と総 PCR 産物量の比率を算出し、各々のメチル化率とした。

## (2) バイサルファイトシーケンス法

PCR 産物は、pGEM-T ベクター (Promega) を用い、クローニングした。各クローンは、M13 Reverse プライマーを用い、ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 装置にて、塩基配列を決定した。1 つのサンプルについて、約 20 クローンずつシーケンスした。また、反復配列 (LINE1 と Alu) のメチル化についても同様の解析をおこなった<sup>26)</sup>。これらの実験は 2 回以上、異なる DNA サンプルを用いておこない、3 回以上の独立した PCR 実験により解析した。また、バイサルファイト処理が十分に行われているかどうか変換率の判定には、CpG 配列以外のシトシン部位のチミンへの変換率を求め、100%変換していることを確認した。



### 3. PCR-Luminex 法を用いたメチル化の解析

#### (1) PCR-Luminex 法の原理

PCR-Luminex 法とは、マルチプレックス PCR 法により、遺伝子を同時に増幅する技術と、フローサイトメトリーを利用したマイクロビーズアレイ技術であるルミネックス法を組み合わせた技術である。マルチプレックス PCR 法を用いることで、今まで遺伝子 1 箇所ずつ増幅していた分の労力とコストの削減が可能となり、微量の DNA であっても、遺伝子配列情報、GC 含量、増幅産物長等を調整し、精度の高い増幅が可能となる。得られた増幅産物は、対応するプローブを固相したビーズと結合させ、蛍光標識することで検出可能となる。これは、特異的なハイブリダイゼーションによる 1 塩基の違いを検出するためのプローブ配列、ハイブリダイゼーション溶液のノウハウと、蛍光の測定にルミネックス装置を用いることにより、測定可能である。また、大量のサンプルを同時処理する事ができる。本法は、すでにヒト白血球抗原（HLA）の遺伝子型判定や、生活習慣病関連 SNP 検査等に用いら

れている（添付資料 図 5）。

## (2) 人工プラスミドの作成

メチル化の検出には、最適なプライマー、プローブ、ハイブリダイゼーション、反応温度、反応時間などの条件を設定する必要がある。まず、PCR を用いて非メチル化プラスミドを作成した。次にメチル化プラスミドは、メチル化酵素を用いて作成した（SssImethylase, New England Biolabs）。

## (3) オリゴプローブによるハイブリダイゼーション

オリゴプローブは、5'端をビオチンでラベルし、100 oligobeads/ $\mu$ l 濃度に調整した。メチル化および非メチル化を認識するオリゴプローブの塩基配列を表 2 に示した（表 2）。ハイブリダイゼーションは、96 穴のプレートで 50  $\mu$ l のスケールでおこなった（オリゴプローブ 5  $\mu$ l、PCR 反応液 5  $\mu$ l、40  $\mu$ l の反応液（3.75M TMAC、

62.5mM TB (pH 8.0)、0.5mMEDTA、0.125% N-lauroylsarcosine)。ハイブリダイゼーション反応は、95°C 2分、48°C30分でおこなった。その後、PBS-Tween を 100  $\mu$ l 加えて、3,300 rpm で1分間遠心し、上清を除去し、ペレットを PBS-Tween で洗浄した。測定は、Luminex 100 flow cytometer 装置でおこない、測定値は定量化した。

#### 4. 統計学的解析

測定した二群間の比率データの有意差検定には、*t*-test を用いた。COBRA 法と PCR-Luminex 法を用いたメチル化値の二群間の比較には、Spearman と Pearson の相関係数式を用いた。

## 5. 倫理審査

東北大学医学系研究科倫理委員会に本研究計画を提出し、承認を得て研究を開始した（受付番号 2009-145）。その後、研究の継続と一部内容の変更を追加した申請をおこない、さらに研究の承認を得た（受付番号 2010-120）。また、協力医療機関であるセント・ルカ産婦人科においても、院内倫理委員会にて、承認を得て研究を実施した。

## <研究結果>

### 1. 登録男性のプロフィール

本研究で登録した患者は 197 例で、その平均年齢は 35.6 歳（25-53 歳）であった。

精液検査で「正常精子」を示す男性は 132 例で、平均年齢は 35.1 歳（28-52 歳）であっ

た。また「乏精子症」の患者は 65 例で、36.6 歳（28-52 歳）であった。このうち 27

例は重度の乏精子症であった。精液所見は WHO の基準により、顕微鏡下にて、精子

数、運動率、奇形率を算出した。また、肥満度（BMI : Body Mass Index）は「正常精

子」群は  $24.1 \pm 3.71$ （平均±標準偏差）、「乏精子症」群は  $24.1 \pm 2.95$  でいずれも「標

準体重」を示し、有意差を認めなかった。染色体検査をおこなった症例は、全て 46XY

の正常核型を示し、内分泌異常の症例は認めなかった。

### 2. 精子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

ヒト精子型インプリント遺伝子 DMR は 3 領域で、H19 領域は 220-bp（18 の CpG

部位)、GTL2 領域は 259-bp (15 の CpG 部位)、ZDBF2 領域は 220-bp (18 の CpG 部位) のメチル化について解析した (図 1-A)。また、精子型インプリント遺伝子の正常値を 90%以上とした。

DMR のメチル化の解析には、制限酵素を用いる COBRA 法と、シーケンス法を併用した。バイサルファイト処理後の精子 DNA を、各 DMR に特異的なプライマーで PCR 増幅し、H19 は制限酵素 TaqI あるいは MluI を、GTL2 は TaqI あるいは NruI、ZDBF2 は TaqI を用いて消化した。メチル化された PCR 産物は制限酵素で切断され、メチル化されない PCR 産物は切断されない。体細胞 DNA では、およそ半分の PCR 産物がメチル化され、残り半分はメチル化されなかった。このことより、PCR によるバイアスがないことを確認した (図 2 ; 血液)。COBRA 法にて、197 例精子 DNA の H19 メチル化解析を行った。その結果、ほとんどの症例で、メチル化されたバンドパターンを認めた。しかし 10 例は、メチル化バンドに加え、非メチル化バンドも認められた。これらの PCR 産物は、さらに、シーケンス法で、各 CpG 部位のメチル化状態

について解析した。（図 2 ; Case C）<sup>22)</sup>。メチル化異常を示した 10 例のうち、7 例は重度乏精子症患者の精子であった。次に、GTL2 および ZDBF2 のメチル化の解析を行った。卵子型インプリント遺伝子のメチル化正常値を 10%以下とした。GTL2 では 16 例、ZDBF2 では 9 例に、異常な非メチル化精子を認めた（表 3）。これらの検体についてもシーケンス法で解析をおこない、同等を確認した。メチル化異常のうち乏精子症は、GTL2 で 8 例、ZDBF2 で 4 例であった。

### 3. 卵子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

同様に、卵子型インプリント遺伝子の 19 領域（DIRAS3, NAP1L5, FAM50B, ZAC (PLAGL1), GRB10, PEG10, PEG1 (MEST), INPP5F-v2, LIT1 (KCNQ1OT1), RB1, SNRPN, ZNF597, ZNF331, PEG3, PSIMCT-1, NNAT, L3MBTL, NESPAS, GNAS1A) について、DNA メチル化の解析をおこなった。全体でメチル化異常は 197 例中 43 例で 21.8%であった。その内訳は、図 3-A 右にまとめた。もっとも異常の頻

度が高い領域は、PEG3（9.8%）、ついで GRB10（8.8%）、NESPAS（7.2%）であった（図 3-A 右）。また、メチル化異常を示す 43 例中 20 例は、複数のインプリント領域の異常であった。また、19 例は、精子型インプリントと卵子型インプリントの両方の異常がみられた。

#### 4. 非インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

精子の DNA メチル化異常が、インプリント遺伝子に特異的であるのか、あるいはゲノム全体のメチル化の異常であるのか検討した。インプリントを受けない反復配列（LINE1 と Alu）について、DNA メチル化の解析をおこなった。これまでと同様に、COBRA 法とシーケンス法を用い、LINE1（413-bp、28 の CpG 部位）と Alu（152-bp、12 の CpG 部位）のメチル化について解析した。その結果、全ての症例で、これら反復配列領域のメチル化に有意な差は認められず、メチル化の異常はインプリント遺伝子に特有な現象と考えられた。



## 5. メチル化インプリント異常の特徴

197 例の精子検体のうち、50 例（25.4%）で、1 遺伝子以上の DMR にメチル化異常が確認された（図 3-A 左）。このうち、乏精子症の症例は 28 例にメチル化異常が認められた（56%）。精子型インプリントの異常は 18%、卵子型は 82%であった（図 3-A 右）。3 領域以上の DMR でメチル化異常を示す症例は 50 例中 18 例で、このうち乏精子症の症例は 14 例（77.8%）であった。メチル化異常の症例については表 3 にその詳細を示した。また、197 症例のうち、65 例（33%）が乏精子症で、このうち、28 例（43%）がメチル化異常を認めた。（カイ 2 乗検定： $p=0.00297$ ）

次に、メチル化異常と精液所見による精子性状との関連性について検討した。メチル化異常の頻度は、「重度乏精子症」では 74.0%（20/27）、「中等度乏精子症」では 21.0%（8/38）、「正常精子」では 16.7%（22/132）で、メチル化異常と精子濃度には負の相関（ $R^2=0.8059$ ）が認められた（図 3-B）。同様に、運動率を 10%以下、10-

40%、40%以上の 3 群に分類した場合、運動率とメチル化異常との間に負の相関

( $R^2=0.7808$ ) を認めた。さらに奇形率を 50%以下、50-65%、65%以上の 3 群に分類

した場合、奇形率とメチル化異常の頻度の間に、正の相関 ( $R^2=0.9643$ ) を認めた。

メチル化異常の有無と年齢および BMI に相関は認めなかった。メチル化異常の程度

について、「重症型乏精子症」、「中等度乏精子症」、「正常精子」について比較検討し

た。図 3-C に示すように、精子所見はメチル化異常の程度にも相関することが示さ

れた。

## 6. 同一症例の精子間のメチル化異常

同一症例の精子を、時期を変えて精液検査をおこない、その都度精子細胞を採取

した。精子型インプリント遺伝子として H19、卵子型インプリント遺伝子として

PEG1 について、メチル化率を解析した。症例 X では、精子濃度が低い精子では、

精子型インプリント H19 のメチル化率は約 50%と異常を示すが、精子濃度が高い精

子では、H19 のメチル化率は正常であった。また、卵子型インプリント PEG1 のメチル化率は全て正常範囲であった。同様に症例 Y では、卵子型インプリント PEG1 が精子濃度の上昇とともにメチル化は正常を示した。このように、同一個体の精子間においても、精子の状態が良い場合、つまり精子濃度が正常な場合にはメチル化異常の頻度が少ない傾向が確かめられた (図 4)。

## 7. DNA メチル化異常診断システムの開発

安全な ART 治療を実施するには、男性精子のインプリント異常を予知する検査法が欠かせない。そのため、ART に用いる精子を的確に、しかも効率良く診断するシステムを開発する必要がある。我々は、PCR-Luminex 法を新規の DNA メチル化解析法として応用することを試みた。

PCR-Luminex 法は、本来ハイスループットで高解像度の遺伝子タイピング（一塩基多型解析）の技術として考案されていた。この PCR-Luminex 法では、特殊なハイ

ブリダイゼーション法を用い、一塩基置換を確認することができる。バイサルファイト処理によってメチル化されたシトシンはそのままシトシンに、メチル化されないシトシンはウラシルに転換されるため、PCR-Luminex 法を用いてメチル化状態を測定することができる。そこで、この PCR-Luminex 法を診断システムとして、臨床応用することが可能と考えた。

#### 1) プラスミドによる PCR-Luminex 法でのメチル化の検討

メチル化プラスミドと非メチル化プラスミドを、各 DMR について作成した。代表例として、作成した ZDBF2 領域のプラスミド DNA のメチル化比率を調整し、PCR-Luminex 法で測定し、回帰曲線検量線で示した（図 5-A）。Luminex 測定値では、この検量線をもとにメチル化率を測定し、安定化した。

次に、ヒト正常血液 DNA と精子 DNA を用い、PCR-Luminex 法と、従来法（COBRA 法とシーケンス法）で ZDBF2 領域の DNA メチル化の解析をおこい、両者による測定値を比較検討した（図 5-B, 5-C）。同様に他の 7 領域についても、インプリン

ト遺伝子の DMR のメチル化パターンは、体細胞（血液）でおよそ 50%を示し、正常精子では精子型インプリントでは 100%、卵子型インプリントでは 0%のメチル化パターンを示した。バックグラウンド・ノイズは、「DNA がない」サンプルを用いて調整した。

## 2) PCR-Luminex 法と COBRA 法の比較

次に、PCR-Luminex 法と COBRA 法のメチル化率について、精子 DNA を用いて比較検討した。両法の比較解析には、Spearman と Pearson の相関係数を用い、統計学的検討をおこなった。その結果、7 領域について相関（H19:  $R^2=0.4464$ 、ZDBF2:  $R^2=0.98$ 、ZAC:  $R^2=0.8227$ 、PEG1:  $R^2=0.9452$ 、LIT1:  $R^2=1$ 、SNRPN:  $R^2=0.7255$ 、PEG3:  $R^2=0.9774$ ）を示したが、GTL2については、弱い相関がみられた（ $R^2=0.238$ ）。

図 6 には、精子型インプリント（H19、GTL2、ZDBF2）が PCR-Luminex 法及び COBRA 法で 90%以下であるメチル化異常例を、卵子型インプリント（ZAC、PEG1、LIT1、SNRPN、PEG3）が 15%以上であるメチル化異常例を示した（図 6）。

## ＜考 察＞

### 1. 不妊症男性精子のメチル化インプリント異常の特異性

インプリント遺伝子のアレル特異的メチル化領域 (DMR) の DNA メチル化率は、体細胞ではおよそ 50% である。しかし、次世代の配偶子では新たにリセットされなければならない。つまり始原生殖細胞で全てメチル化は消去され、成熟した精子は、受精前に父由来（精子型）の DMR でメチル化を完全に獲得する。また、精子では母由来（卵子型）の DMR のメチル化は獲得しない。今回 197 例の男性精子 DNA を用い、22 領域の DMR（精子型 3 領域、卵子型 19 領域）について、DNA メチル化の解析をおこなった。その結果、全体で 25.4%（50/197）の症例に、メチル化異常を認めた。異常のあった精子のうち、38.0%（19/50）は、父（精子）と母（卵子）由来の両方の DMR に異常を認めた。また、精子にみられるメチル化の異常と形態学的な精液所見との間に相関がみられた。つまり、精子濃度（数）や運動率が低いほどメチル化異常の頻度は高く、奇形率が高いほどメチル化異常の頻度は高いこと

が明らかとなった。乏精子症の患者の精子では 43.1% (28/50) に異常を認めた。この結果は DNA メチル化の確立、維持に精子形成能が強く関連していることが示唆された。実際に、メチル化酵素欠損マウスでは、メチル化インプリントの異常を示し、生殖細胞の形成不全が認められている<sup>28,29,30)</sup>。また、これらのメチル化異常はインプリント領域特異的で、非インプリント遺伝子の DNA メチル化は正常であった。この事実より、インプリント遺伝子の DMR は、より変化を受けやすい領域であるのかもしれない<sup>31)</sup>。

ヒト精子におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化の獲得に関する報告は少ない。Marques らは、H19 遺伝子のインプリント異常と精子形成異常の間に関連があることを報告している。Marques らの H19 の CTCF 結合領域では、「重症型乏精子症」におけるメチル化異常の頻度が高く (30%)、「正常精子」の場合では、頻度は低いことを報告している<sup>21)</sup>。我々の結果も、H19 のメチル化異常の報告とほぼ一致している<sup>22)</sup>。今回の解析で、メチル化インプリントの異常は、H19 だけでなく、他

のインプリント遺伝子においても存在することを明らかにした。GTL2 のメチル化異常は 32.0% (16/50) で、ZDBF2 は 18.0% (9/50) であった。母由来のメチル化異常は、父由来のメチル化インプリントの異常より、その頻度が高い。メチル化異常のうち 82%は母由来のメチル化異常であった。この結果は、解析した母由来の DMR の数が多いことが原因であるかもしれない。あるいは、このメチル化異常は配偶子形成過程における母由来 DMR のメチル化の消去の異常かもしれない<sup>32)</sup>。

インプリント遺伝子には、繰り返し配列が含まれることが多い。メチル化異常が繰り返し配列に特有な現象であるのか、インプリント遺伝子に特有な現象であるのか、区別するため LINE、Alu のメチル化解析を行った。その結果、インプリント遺伝子特有な現象であることがわかり、この領域が変化を受けやすいと考えられた。

メチル化の異常の頻度の比較的高い領域は、GTL2、GRB10、PEG3 のインプリント領域であった。これらの遺伝子機能欠失マウスの解析では、GTL2 は胎盤の発育不良、GRB10、PEG3 は胎児の発育不良が報告されている<sup>33)</sup>。また、これらのイン



プリント遺伝子が、新生児の成長や発達異常に関連することも示されている。(MRC

Mammalian Genetics Unit, Harwell UK. URL:

<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/function.html>)。また GRB10 は、Silver

Russell 症候群の発症に関与する原因遺伝子の 1 つとしても報告されている<sup>34)</sup>。

## 2. 精子のメチル化異常のメカニズム

メチル化インプリント異常を認めたほとんど全ての症例は、部分的なメチル化異常であった。この異常は、特異性はなく様々な領域に分散していた。DNA メチル化酵素 (Dnmts) やメチル化結合蛋白はおそらく、生殖細胞でのメチル化の獲得の重要な調節因子と考えられている<sup>28-30,35-37)</sup>。Dnmt3a と 3L ノックアウトマウスでは、いずれも雌マウスは、母由来インプリント遺伝子のメチル化の獲得の障害のため、胎生中期に流産となる。また、雄の場合はその表現型は乏精子症である。不妊症患者でまだこれらの遺伝子の異常の報告はない。DNMT1 の卵子型アイソフォーム

(Dnmt1o) の異常で一卵性双胎のうち 1 児にインプリント異常症である Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) が認められた報告がある<sup>38)</sup>。また、最近 Annaud らは Dnmt3L のノックアウトマウスではその母由来アレルのメチル化の異常は不完全で、Dnmt3L 以外の蛋白がメチル化の獲得に必要ではないかと報告している<sup>39)</sup>。

さらに加齢とともに遺伝子の発現は環境変化の影響を受けるため<sup>37)</sup>、たとえば生殖細胞でインプリント遺伝子の DNA メチル化の獲得に必要な Dnmt3 蛋白の発現変化により、異常が生じるのかもしれない。部分的なメチル化異常の原因は不明である。

しかし、この異常の程度は精液所見と合致する。つまり、精子濃度が低い場合 (運動率が低く、奇形率が高い)、メチル化異常の程度は高くなる。この傾向は同一症例の精液でも確かめられた。このような事実よりメチル化異常と精子形成能には、密接な関連があることが考えられた。

### 3. 新規 DNA メチル化診断システムの開発

現時点で不妊治療検査においてインプリンティング異常を正確に評価しようとする試みは皆無である。前述のように DNA メチル化解析法は、精子 DNA をバイサルファイト処理し、鋳型に複数のアレル特異的メチル化領域を個別に核酸増幅し、さらに制限酵素を用い消化後、ゲルに電気泳動しバンドの濃淡を特殊な器械を使って測定する COBRA 法とシークエンサーを用い、ラベルされた塩基をひとつずつ解析するシーケンス法を併用する方法を用いているため、診断の確定には強力なツールであるものの、多大な労力と操作に約 1 週間以上費やし、体外受精等の臨床診断レベルでの利用には不向きである。また、費用も 1 症例あたり約 10 万円と高額である。したがって、本研究成果を今後の不妊治療を安全に実施するための検査として広く世の中に普及させるためには、簡便で制度の高い診断システムを開発することが重要である。

我々は、DNA メチル化を解析する新しい方法として、PCR-Luminex 技術を応用し

た診断法を開発し、多数の精子サンプルを用いて、その性能評価をおこなった。こ

の PCR-Luminex 法は Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotide

Probes (PCR-SSOP) プロトコルを利用し、迅速でかつハイスループットな定量法で

ある<sup>39,40)</sup>。本来、この方法は、HLA タイピングや遺伝子多型を認識するために用い

られていた。今回の DNA メチル化解析への応用は、我々が世界で初めてである。

本研究では、父由来 DMR の 3 領域 (H19、GTL2、ZDBF2) と、母由来 DMR の

5 領域 (ZAC、PEG1、LIT1、SNRPN、PEG3) の DNA メチル化について定量解析を

おこなった。この測定結果は、従来法である COBRA 法の結果と比較し、従来法と

同等のメチル化比率を示した。しかし、GTL2 について PCR-Luminex 法と COBRA

法データの相関が低い原因として、PCR で増幅する際、塩基配列構造上の特性や

PCR の条件設定があると考えられ、さらに至適条件の検討が必要と考えられる。今

後さらに領域を拡大し、22 領域全てにおいて信頼できる結果が得られるような技術

開発を進めていく計画である。ART の臨床の場合において、本システムによる検査を

導入することで、予めインプリント遺伝子のメチル化異常が少ないと思われる精子を使用することが可能となり、ARTにおける信頼性、安全性を高める一助になるとともに、高額で長期間の治療が必要となる不妊治療において患者の経済的および身体的負担の低減につながることを期待できる。さらに、メチル化異常を原因とする先天性疾患、癌などの診断および予防法として広く応用可能である。実用化に向け今後も開発を進めていく。

#### 4. DNA メチル化異常とリスク要因

先天性インプリント異常症は、IVF や ICSI 症例に多い傾向にあるが、リスク要因となりうる ART 操作は、排卵誘発法や量、胚培養液の種類など様々であり、特定するに至っていない。以前我々は排卵誘発刺激が卵子インプリント異常を引き起こすことを報告した<sup>41)</sup>。また、メチル化の異常は、体外培養によって生じる事も報告されている。マウスでは、培養液の組成や体外操作によるメチル化異常についての報

告が数多くある。ICSI は男性不妊症に有効な治療法で、通常排卵誘発や胚培養を行う。しかし、1) 男性不妊の原因となる異常の遺伝、2) 不妊症精子の潜在的障害、3) インプリント異常の問題などが懸念されている<sup>42)</sup>。実際に、Angelman 症候群 (AS) や Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の患者は ICSI と関連があることが多い。現時点で ART のリスク要因は特定できていないが、様々な要因 (排卵誘発、体外培養など) が加わり、確率的にリスクをあげていることが予想される。エピゲノム異常は、先天性疾患、小児がんにとどまらず、小児の身体的、精神的発育・発達、性格形成、行動異常等に関連し、さらに癌や生活習慣病など成人の難治性疾患の原因となりうる。ART 出生児のエピゲノム変異についてゲノムワイドな解析と確率的疾患リスク評価を行い、安全で質の高い生殖医療の実現を目指す必要がある。

## ＜結 論＞

男性精子のおよそ 25%にメチル化インプリントの異常を示した。また、メチル化異常と精液性状に強い相関関係がみられ、メチル化異常は精子形成能に密接に関連していることが示唆された。また、PCR-Luminex 法は、迅速で正確な診断法として臨床現場において応用可能な新しいDNA メチル化診断法として有用と考えられた。今後実用化に向けた開発を進めていく。

## <謝 辞>

本研究の遺伝子解析にあたり、ご協力頂きました患者さま、ご家族の方々に深謝致します。

本研究は東北大学情報遺伝学分野の樋浦仁助教、岡江寛明助教、千葉初音助教、技術補佐員の宮内尚子さん、佐藤芙美さんのご協力を得て施行することができました。心より感謝申し上げます。

また、精子サンプル収集に関して、セント・ルカ産婦人科院長宇津宮隆史先生、事務長宇津宮富美子様、スタッフの皆さまのご支援、およびご協力に深く感謝いたします。

また、このような研究の機会を与えて下さいました、周産期医学分野の八重樫伸生教授、情報遺伝学分野の有馬隆博教授をはじめ、ご協力頂いた諸先生方にも御礼申し上げます。



## ＜参考文献＞

- (1) Niemitz EL, Feinberg AP: epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 599-609.
- (2) Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S: The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346 : 725-30.
- (3) Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS: Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002; 346: 731-7.
- (4) Paulsen M, Ferguson-Smith AC: DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001; 195: 97-110.
- (5) Surani MA: Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 1998; 93: 309-12.
- (6) Tilghman SM: The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 1999; 96:185-93.
- (7) Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM: Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 839-49.
- (8) Obata Y, Kono T: Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem* 2002; 277: 5285-9.
- (9) Davis TL, Trasler JM, Moss SB, Yang GJ, Bartolomei MS: Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics* 1999; 58: 18-28.
- (10) Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS: The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2885-94.

- (11) Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, Niwa K, Kawase Y, Kono T, Matsuda Y: The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 2000; 5: 649-59.
- (12) Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP: Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* 2004; 84: 952-60.
- (13) Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W: Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R47-58.
- (14) DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP: Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 156-60.
- (15) Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W: Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART) . *J Med Genet* 2003; 40: 62-4.
- (16) Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC: Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction* 2002; 17(1): 13-6.
- (17) Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH: High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Human Reproduction* 2002; 8(3): 286-98.
- (18) Gianotten J, van der Veen F, Alders M, Leschot NJ, Tanck MW, Land JA, Kremer JA, Hoefsloot LH, Mannens MM, Lombardi MP, Hoffer MJ: Chromosomal region 11p15 is associated with male factor subfertility. *Mol Human Reproduction* 2003; 9(10): 587-92.
- (19) Qiu J: Epigenetics: unfinished symphony. *Nature* 2006; 441: 143-145.

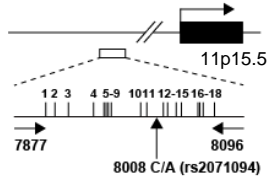
- (20) Manning M, Lissens W, Weidner W, Liebaers I: DNA methylation analysis in immature testicular sperm cells at different developmental stages. *Urol Int* 2001; 67: 151-5.
- (21) Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, Jouannet P, Jeanpierre M: Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2183-7.
- (22) Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, Barros A: Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363: 1700-2.
- (23) Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, Weidner W, Steger K: Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 407-11.
- (24) Ushijima C, Kumasako Y, Kihale PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T: Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2000; 15: 1107-11.
- (25) Bahnak BR, Wu QY, Coulombel L, Drouet L, Kerbiriou-Nabias D, Meyer DA: simple and efficient method for isolating high molecular weight DNA from mammalian sperm. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1208.
- (26) Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP: A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e38.
- (27) Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor, TH: Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001; 294: 2536-9.
- (28) Hata K, Okano M, Lei H, Li E: Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002; 129: 1983-93.
- (29) Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H: Essential role for

- de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004; 429: 900-3.
- (30) Reinhart B, Eljanne M, Chaillet JR: Shared role for differentially methylated domains of imprinted genes. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2089-98.
- (31) Reik W, Walter J: Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 21-32.
- (32) Okano M, Xie S, Li E: Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 1998; 19: 219-20.
- (33) Zhou Y, Cheunsuchon P, Nakayama Y, Lawlor MW, Zhong Y, Rice KA, Zhang L, Zhang X, Gordon FE, Lidov HG, Bronson RT, Klibanski A: Activation of paternally expressed genes and perinatal death caused by deletion of the Gtl2 gene. *Development* 2010; 137(16): 2643-52.
- (34) Shiura H, Nakamura K, Hikichi T, Hino T, Oda K, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Kaneko-ishino T, Ishino F: Paternal deletion of Meg1/Grb10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth retardation. *Hum Mol Genet* 2009; 18(8): 1424-38.
- (35) Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E: DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
- (36) Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS: Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2263-78.
- (37) Bestor TH. Imprinting errors and developmental asymmetry: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 358: 1411-5.
- (38) Arnaud P, Hata K, Kaneda M, LiE, Sasaki H, Feil R, Kelsey G: Stochastic imprinting in the progeny of Dnmt3L<sup>-/-</sup> females. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 589-98.

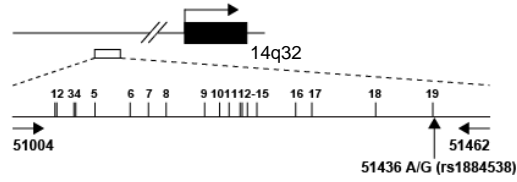
- (39) Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, Jacobson JW: Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the LuminexLabMAP system. *J Microbiol Methods* 2003; 53: 245-52.
- (40) Baart EB, Martini E Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS, Fauser BC: Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007; 22(4): 980-8.
- (41) Dumoulin JC, Derhaag JG, Bras M, Van Montfoort AP, Kester AD, Evers JL, Geraedts JP, Coonen E: Growth rate of human preimplantation embryos is sex dependent after ICSI but not after IVF. *Hum Reprod* 2005; 20(2): 484-91.

# <図 表>

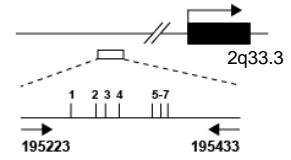
(a) *H19* (AF125183)



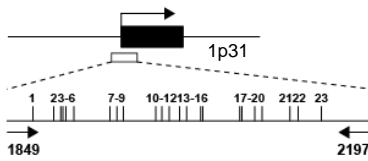
(b) *GTL2* (AL117190)



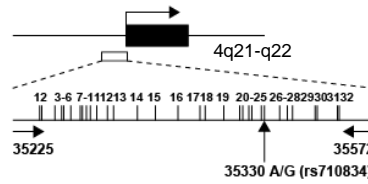
(c) *ZDBF2* (AC007383)



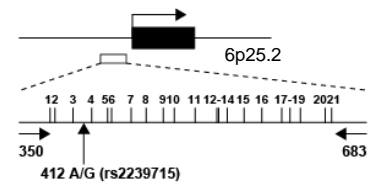
(d) *DIRAS3* (AF202543)



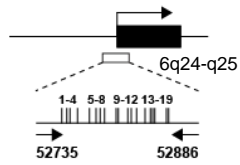
(e) *NAP1L5* (AC108065)



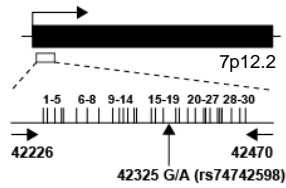
(f) *FAM50B* (Y18504)



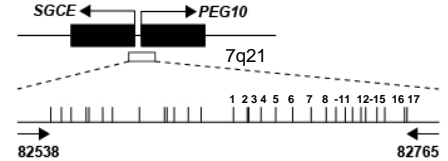
(g) *ZAC* (AL109755)



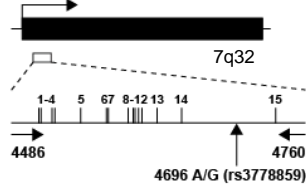
(h) *GRB10* (AC004920)



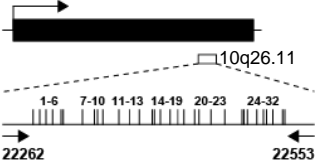
(i) *PEG10* (AC069292)



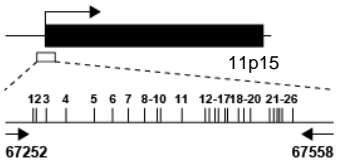
(j) *PEG1* (AB045582)



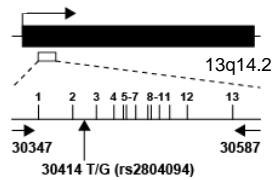
(k) *INPP5F v2* (AL133461)



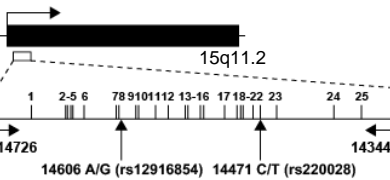
(l) *LIT1* (U90095)



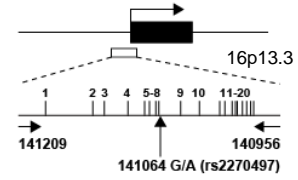
(m) *RB1* (AL392048)



(n) *SNRPN* (U41384)



(o) *ZNF597* (AC025283)



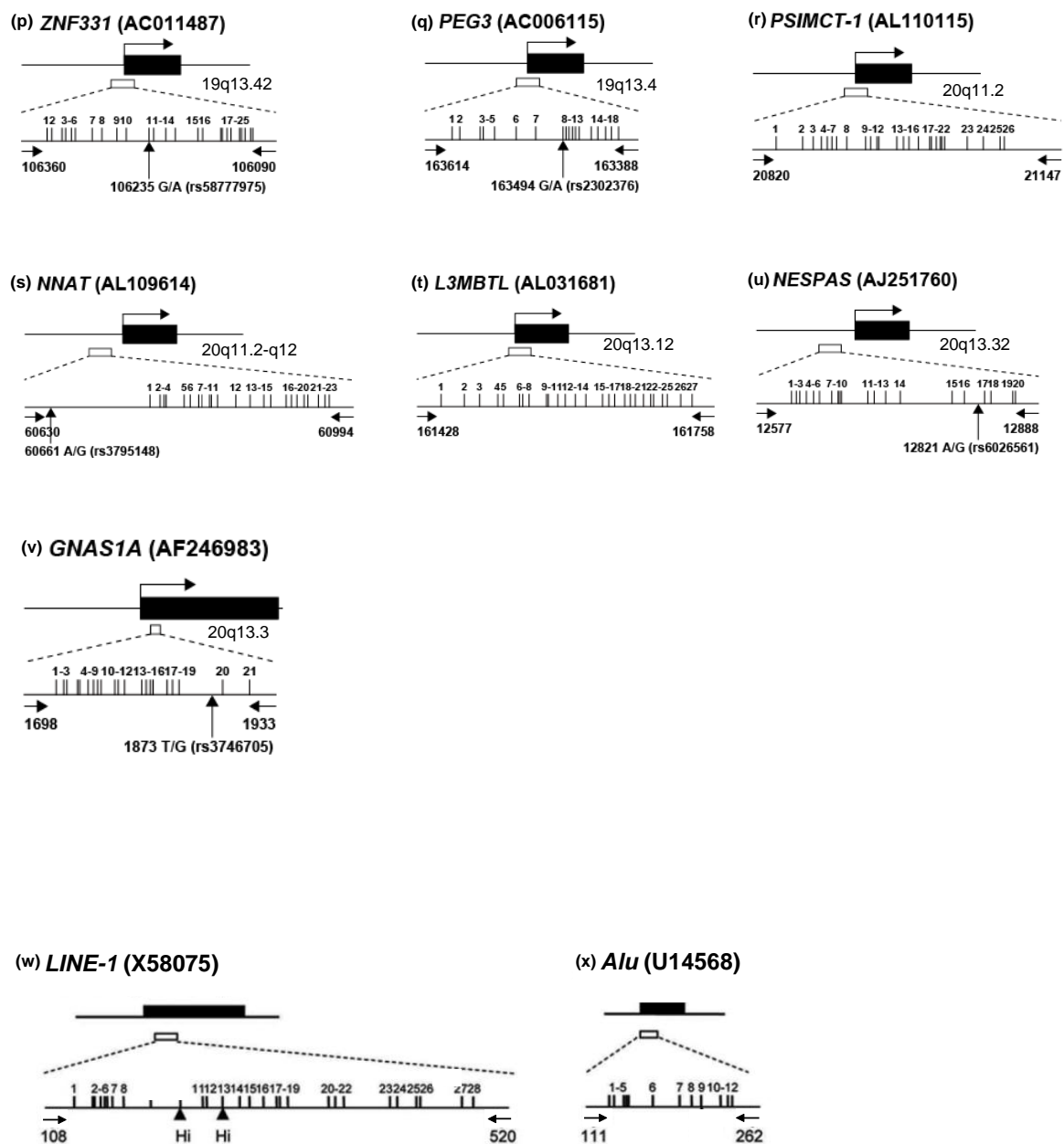


図1 ヒトインプリントの遺伝子マップ

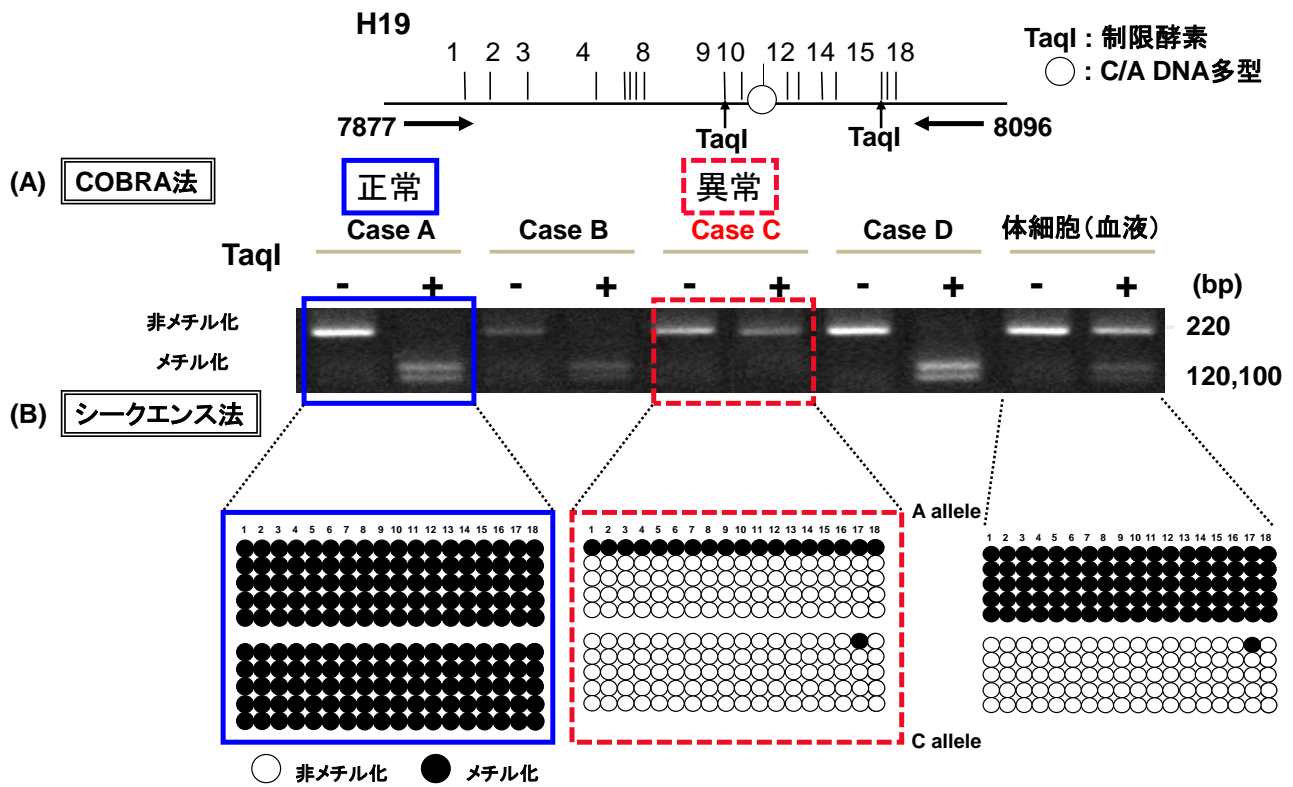
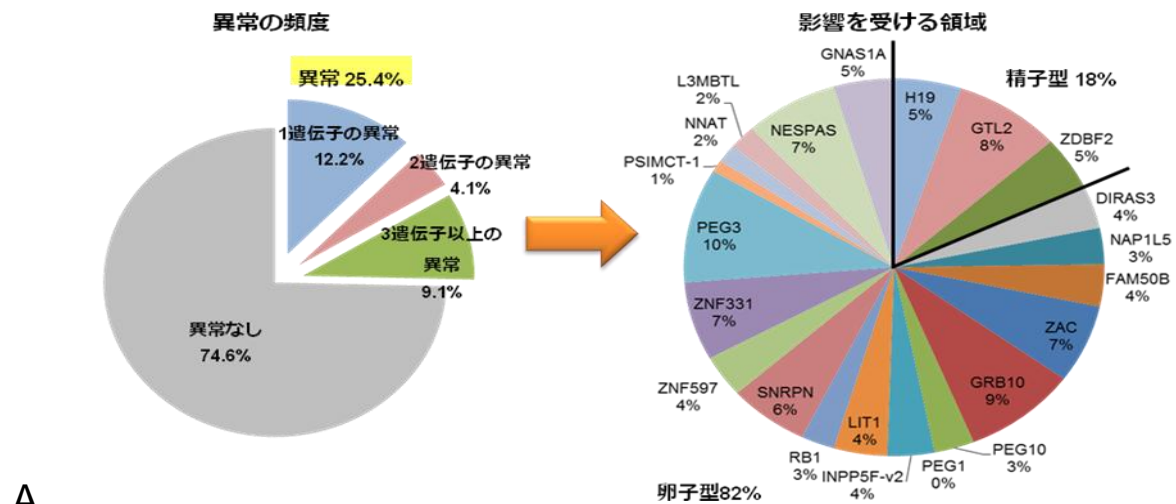


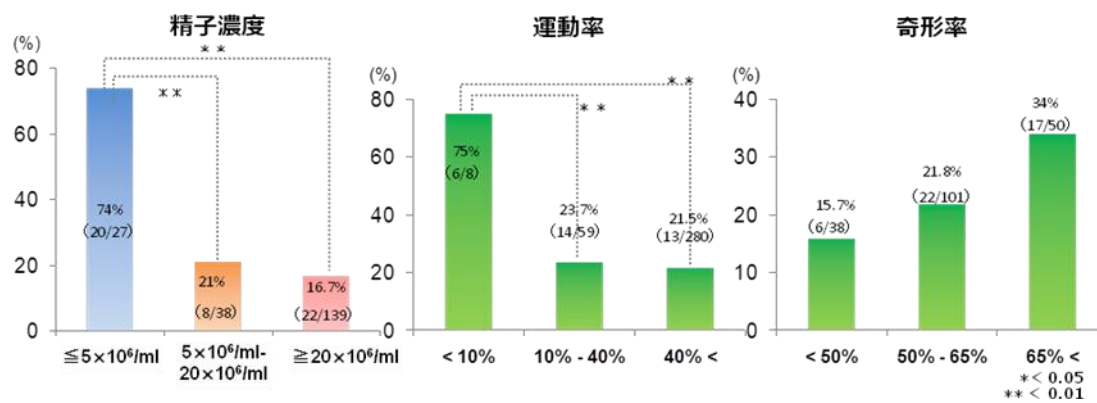
図2 H19 遺伝子 DMR のメチル化インプリントの解析





A

B



C

### 精子濃度とメチル化率分布

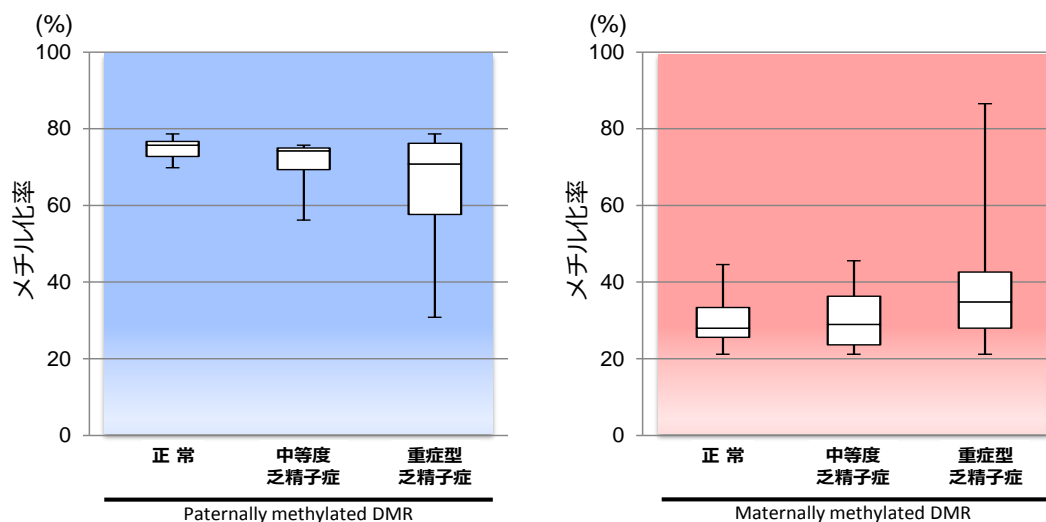


図3 メチル化インプリント異常の頻度と精子所見との関連性

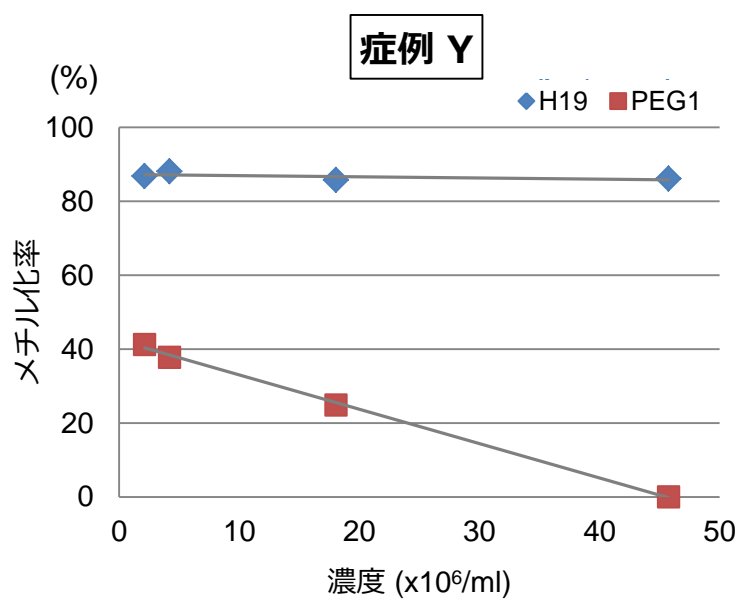
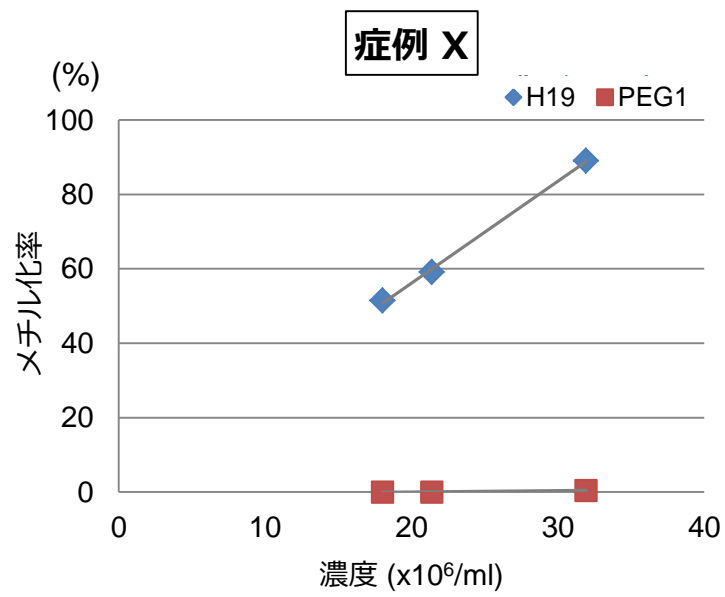
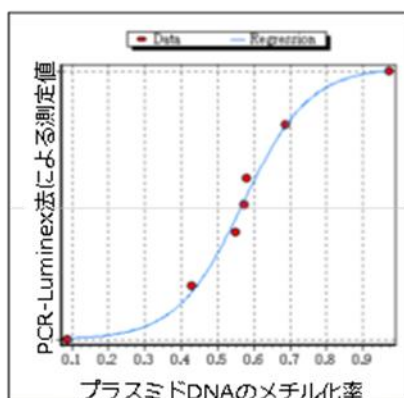
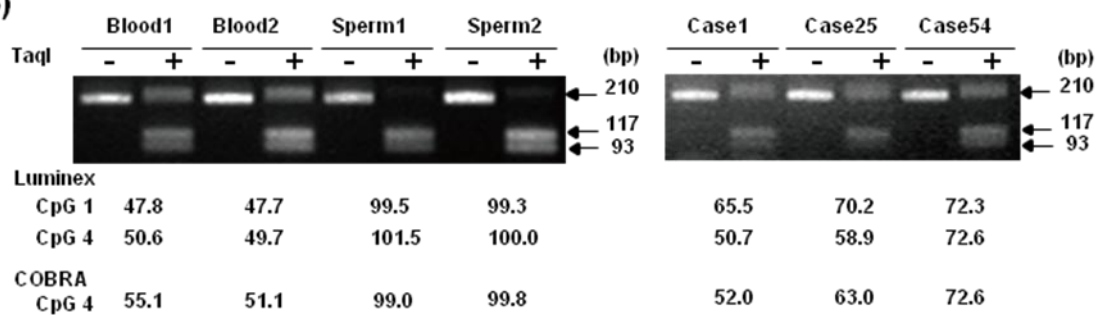


図 4 個体内精子間での精子濃度とメチル化の変動

(A) ZDBF2/DMR



(B)



(C)

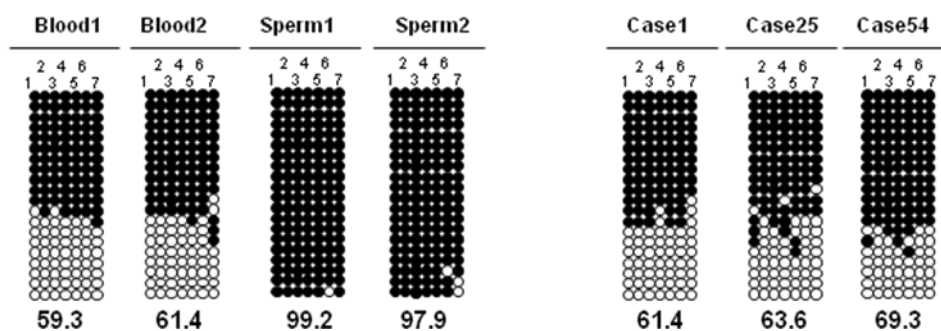
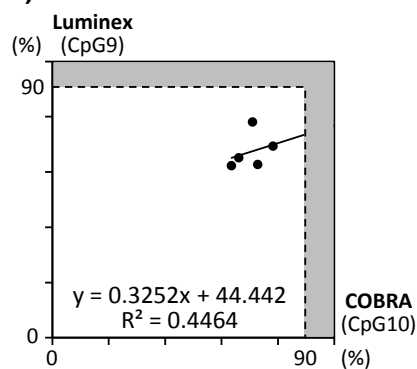
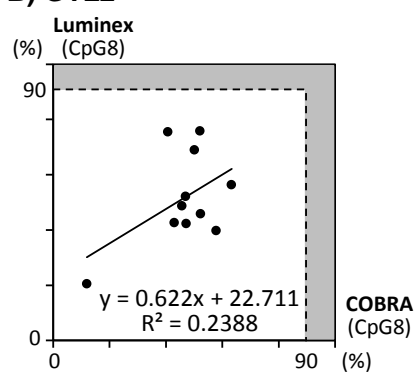


図5 PCR-Luminex法とCOBRA法のメチル化率の比較検討

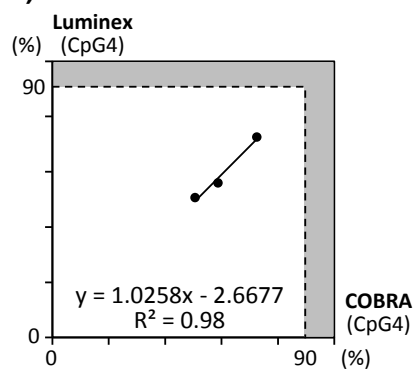
### A) H19



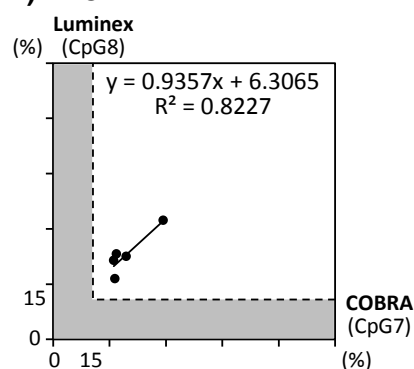
### B) GTL2



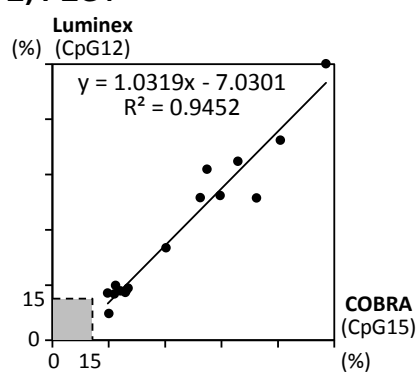
### C) ZDBF2



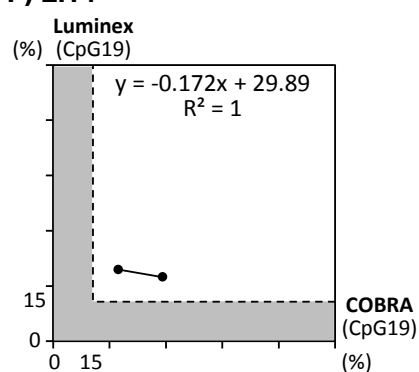
### D) ZAC



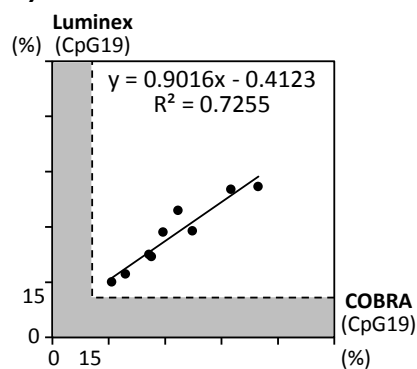
### E) PEG1



### F) LIT1



### G) SNRPN



### H) PEG3

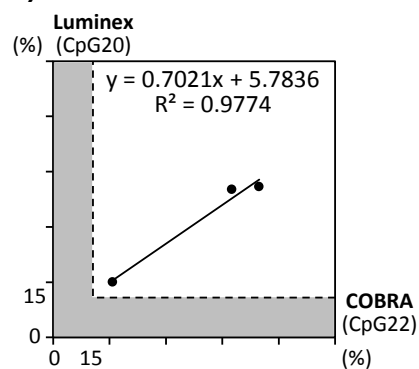


図 6 精子を用いた PCR-Luminex 法と COBRA 法の関連性

表 1 Bisulphite PCR 解析で用いたプライマー配列

Gene	Target	Primer sequence (5'-3')		Amplicon (bp)	Annealing	Restriction Enzyme	Accession No.	chromosomal location
H19	BS	H19 F2	TATATGGGTATTTTGGAGGTTTTT	220	57	Taq1 Mlu1	AF125183	11p15.5
	SNP	H19 R1	ATAAATATCCTATTCCCAATAACCCC	395	68			
		hH19DMR sF1	AGGTTGGGGAGATGGGAGGAGATAC					
		hH19DMR sR1	GTGGATAATGCCCGACCTGAAGATC					
GTL2	BS	GTL2 BSF1	GGGTTGGGTTTTGTAGTTGTTTTGT	459	57	Taq1 Nru1	AL117190	14q32
		GTL2 BSR1	ACAATTTAACAACAACCTTTCCTCCAAA					
ZDBF2	BS	ZDBF2 BSF1	GTTTTGTTAGTTAGATTGGAATAA	210	57	Taq1	AC007383	2q33.3
		ZDBF2 BSR1	AAAAATAATTAACCTAAAAATAAAAC					
DIRAS3	BS	DIRAS3 BSF1	TGTTGTTTTGTTGATATTTGTTGTT	349	57		AF202543	1p31
	SNP	DIRAS3 BSR1	CCTTAAACTTCTAAACTAACCCCTC	321	65			
		DIRAS3 SF1	ACTTACCTTTCTCGGAGGCACG					
		DIRAS3 SR1	AACAGTTCCTCCCAACCTGTAAAC					
NAP1L5	BS	NAP1L5 BS2F1	TGATAGTGGGAAGTTAGTTAAGTGT	348	57		AC108065	4q21-q22
	SNP	NAP1L5 BS2R1	AAAAATCTAAACTCCTCAACCATC	202	66			
		NAP1L5 SF1	GCTGTCAcAGTCTCCACCCCTGC					
		NAP1L5 SR1	CCGCATCCGCAAGATCTCTCTG					
FAM50B	BS	FAM50B cBSF1	GGTTTTGAGGAGAGTGTTAGGTTTT	334	57		Y18504	6p25.2
	SNP	FAM50B cBSR1	AAACTCTCTAAATAACCACAACAACCTTAC	218	67			
		FAM50B SF1	CAGGTAATGTTTCACGAGACGCCACAG					
		FAM50B SR1	GGGGCTCCTGTTTTACGCGTGTG					
ZAC	BS	ZAC F	GGGGTAGTYGTGTTTATAGTTTAGTA	152	57	Taq1	AL109755	6q24-q25
		ZAC R	CRAACACCCAACACCTACCCTA					
GRB10	BS	GRB10 BSF2	GTTAGGGGTTTTGYGYGTAGAAAT	245	55		AC004920	7p12.2
	SNP	GRB10 BSR2	CCAATCCCTCRAAAACTAA	185	69			
		GRB10 SF1	GAACGCGCTAGCAGCAAAAAGC					
		GRB10 SR1	CAGTCCCTCGGAGGCTGAGTATTG					
PEG10	BS	PEG10 BSF1	TTTAGTTTGGTTAGTTTAGTATTAGTATT	395	55		AC069292	7q21
		PEG10 BSR1	AAAAATAAAATCCACACCTAAAC					
PEG1	BS	hPEG1 BSF1	AATTTTAATTATTTGATGAGTTATGAG	275	57	Taq1	AB045582	7q32
	SNP	hPEG1 BSR1	ATATTTTTCAAATTTCAATAACAAAC	315	61			
		PEG1DMR sF2	GTATCACGGTGGCGGGAGTC					
		PEG1DMR sR2	ATGAGCGGAGACAATAAGCAAAC					
INPP5Fv2	BS	INPP5Fv2 BS4F1	TAGGAATTTTAATTATAAGTTTGTAA	203	55		AL133461	10q26.11
		INPP5Fv2 BS4R2	AATACAACAACATATTTAAACCTC					
LIT1	BS	LIT1 F	TTTTGGTAGGATTTTGTGGAGGAGT	307	57	Taq1	U90095	11p15
		LIT1 R	CCTCACACCCAACCAATACCTC					
RB1	BS	RB1 BSF2	GTGAAAGTGGGTTTTGGGTAGTTTG	241	59		AL392048	13q14.2
	SNP	RB1 BSR1	CTTAAACATTTCCAAAACCTACCCTACC	480	68			
		RB1 SF1	CCGCCGCCTCTACGTTTCCCTTTTG					
		RB1 SR1	CCTAGACGCTGACCATTCCCCACAAG					
SNRPN	BS	hSNRPN BSF1	AGGAGGTTATGGTAGTGGATTAGG	383	59	Hha1	U41384	15q11.2
	SNP	hSNRPN BSR1	CACCACAATAAACAACCAATAAAC	335	68			
		SNRPN-DMR sF3	ACCGAGGCGAGGAGGCTATG					
		SNRPN-DMR sR3	GACTGTGCTACTGCCCTTCTCTG					
ZNF597	BS	ZNF597 BSF1	GTTTTTGTAGAGGAGTTGTAGAAAG	254	57		AC025283	16p13.3
	SNP	ZNF597 BSR1	CAACTACCCAATAACTACAATCCTC	409	67			
		ZNF597 SF1	CGGGTGGGGAATGCCCTTCTCAAG					
		ZNF597 SR1	GAGAACTTCGACCAATCAAGGGCAGG					
ZNF331	BS	ZNF331 BSF2	GTGCGGTTTTGTGTGTTTGTATAT	270	57		AC011487	19q13.42
	SNP	ZNF331 BSR1	ATCCCRCCACCCCTAAAAACCAAC	456	69			
		ZNF331 SF2	CGTGTCAGTGTGTCCGCGTGTCA					
		ZNF331 SR2	GGCTGCGTCACTGGTGCAAAACG					
PEG3	BS	PEG3 BS2F3	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAGAAGTT	227	55	Taq1	AC006115	19q13.4
	SNP	PEG3 BS2R0	CTCACTCTACCTCAATACTACRCAAC	342	66			
		PEG3-DMR sF1	CTGTGCCCACTCTCGGACTG					
		PEG3-DMR sR1	CACCTCGGTGCAGAAGTCTGG					
PSIMCT-1	BS	PSIMCT-1 BSF1	GGATGTAGTTGGATATATTTTTTTT	328	55		AL110115	20q11.2
		PSIMCT-1 BSR1	ACTTATCAAACCTACTATTTCAAC					
NNAT	BS	NNAT BS2F1	TTTTAGTTAGTGGGTTTTTTGTATT	365	55		AL109614	20q11.2-q12
	SNP	NNAT BS2R1	CATTACACCTCCATCTACTACTAACCTAT	237	61			
		NNAT S2F1	TCAAACAGCCCAAGCTCACTTTG					
		NNAT S2R1	ACCTCTTTCAGCAAGCTGCCTG					
L3MBTL	BS	L3MBTL BSF0	GTGTAGTTTGGAGTGAGGTTTTTTG	331	55		AL031681	20q13.12
		L3MBTL BSR2	AAACCCAACCTCAAACTAAAAAAC					
NESPAS	BS	NESPAS BSF1	AGTAAAGTTTTTTAGGGAGTAGTTG	312	55		AJ251760	20q13.32
	SNP	NESPAS BSR1	AACAAACTATAATAAACTAAAAAACTAA	287	62			
		NESPAS SF1	CATGGTATTTATCTGTGGGTTTCAG					
		NESPAS SR1	GCAGGGTGCTCTCTTGTTTATG					
GNAS1A	BS	GNAS1A BSF1	GTGTGAGTGATTTTTATTTATATGAAGT	236	55		AF246983	20q13.3
	SNP	GNAS1A BSR1	AACAAAAATCTATTTACCCTCAAC	251	67			
		GNAS1A SF1	GCTGCCTTGCGGTGTGAGTGC					
		GNAS1A SR1	CGGATGGCAGGAGTCTGTTTACC					
LINE-1	BS	LINE-1 BSF	TTGAGTTGTGGTGGGTTTTATTTAG	413	50		X58075	
		LINE-1 BSR	TCATCTCACTAAAAATACCAACA					
Alu	BS	Alu BSF	GATCTTTTTATTAATAAATATAAAATTAGT	152	43	Mbo1	U14568	
		Alu BSR	GATCCCAAACTAAAAACAATAA					

表 2 PCR-Luminex 法で用いたオリゴプローブの塩基配列

Target genes			Sequence (5'—3')
H19	probe (CpG 9)	Me	TTATAGTTCGAGTTCGTTT
		Un	ATTATAGTTTGAGTTTGTTT
	probe (CpG 16)	Me	AGTTACGCGTCGTAGG
		Un	AGTTATGTGTTGTAGGG
GTL2	probe (CpG 4)	Me	CCTAATAAATCGCGAACAA
		Un	CCTAATAAATCACAAACAA
	probe (CpG 8)	Me	GTTGTTTGAGGTTTATAG
		Un	CTATAAACCTCAAACAAC
ZDBF2	probe (CpG 1)	Me	ATTCAAAACCGCAATAAACT
		Un	ATTCAAAACCACAATAAACTA
	probe (CpG 4)	Me	CAACTACTCGAATAACTAAA
		Un	CAACTACTCAAATAACTAAA
PEG1	probe (CpG 15)	Me	TTATGGTGCGTCGAGAT
		Un	GGTTATGGTGTGTTGAGAT
LIT1	probe (CpG 5)	Me	GTTATTGGTCGAAAGAGTT
		Un	GTTATTGGTTGAAAGAGTT
	probe (CpG 17)	Me	TGTTTTCGTCGTTGTGCGAT
		Un	TTGTTTTTGTGTTGTTGAT
	probe (CpG 19)	Me	TGCGGTAGCGTTTCGAT
		Un	ATTGTGGTAGTGTTTTGATT
ZAC	probe (CpG 8)	Me	GGTACGTTTCGAGCGGT
		Un	GGTATGTTTGAGTGGTT
SNRPN	probe (CpG 16)	Me	AATATACGCGTTAAT
		Un	AATATATGTGTTAAT
	probe (CpG 19)	Me	TAAGTATGTTTGTGTGGTTGT
		Un	TAAGTATGCTTGTGTGGTTGT
PEG3	probe (CpG 20)	Me	GCGGTCGAAGGCGTATTTA
		Un	GTGGTTGAAGGTGTATTTA

表 3 不妊症男性精子のメチル化異常

番号	精子	年齢	BMI	濃度	運動率 (%)	奇形率 (%)	H19	GTL2	ZDBF2	DIRA33	NAP115	FAM50B	ZAC	GRB10	PEG10	PEG1	INP5F v2	LIT1	RB1	SNRPN	ZNF597	ZNF331	PEG3	PSMCT -1	NNAT	L3MBTL	NESPAS	GNAS1A
1	Moderate	37	22.9	18.7	63	57	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Severe	34	20.7	0.1	17	75	+	+	76	-	-	-	21	28	-	-	-	27	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
8	Severe	33	26.6	ND	ND	ND	30	ND	ND	-	35	42	53	39	37	-	32	-	29	30	30	26	-	-	ND	50	40	26
15	Severe	40	25.9	5.0	13	81	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	38	-
16	Severe	33	23.0	0.2	67	67	77	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-	35	-	-	-	-	-	28	-
22	Severe	45	24.0	4.4	27	67	+	+	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-	23	-	-	-	-	-
25	Severe	52	24.2	0.8	17	83	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-
28	Severe	35	22.3	4.7	37	71	+	70	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-
31	Severe	28	21.8	ND	ND	ND	55	71	+	47	21	53	47	28	55	-	38	56	23	58	35	33	45	-	-	43	ND	-
32	Severe	38	29.4	ND	ND	ND	50	ND	ND	42	-	52	47	31	40	-	-	88	-	67	40	ND	28	-	-	ND	28	-
43	Normal	28	22.4	72.3	51	53	+	+	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	Moderate	38	26.4	10.8	48	46	+	+	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Normal	32	24.5	50.6	66	52	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	-	-
66	Normal	33	27.3	22.2	46	54	76	71	+	39	-	-	-	22	22	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-	-	26	24
70	Severe	34	21.7	1.3	52	60	60	71	+	43	35	29	-	32	22	-	32	29	22	39	22	36	60	28	39	-	-	43
77	Normal	45	24.5	43.6	55	55	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	27	-	-	-	-	-
81	Moderate	45	20.0	14.1	22	69	+	+	74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	22	-
82	Severe	46	20.6	3.3	74	+	+	76	+	-	-	-	41	74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	Normal	29	21.5	57.6	66	39	+	77	79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	Normal	26	22.6	127.6	66	67	+	76	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	Normal	32	22.1	41.7	53	57	+	73	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	Severe	37	23.6	ND	ND	ND	+	78	ND	48	37	55	43	37	54	-	39	70	30	52	32	47	44	36	56	40	51	42
90	Normal	35	31.2	23.2	48	58	+	+	+	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	Normal	40	26.4	24.0	48	72	+	73	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	Moderate	43	26.0	14.0	56	56	+	56	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	-	-	21
97	Normal	38	22.9	111.4	80	34	+	78	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	Moderate	37	24.8	17.2	63	59	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-
109	Normal	37	21.2	52.0	51	57	70	74	77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	-	-
111	Severe	32	25.4	4.6	16	80	+	75	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-
115	Normal	30	23.5	54.1	28	70	+	76	+	-	-	22	21	-	-	-	-	52	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-
120	Severe	40	25.9	0.2	20	80	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-
122	Severe	45	24.4	0.7	46	47	+	+	+	-	-	-	30	22	-	-	-	-	43	-	25	-	-	-	-	-	31	-
125	Normal	38	29.1	38.9	66	53	+	+	+	-	-	-	28	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-
128	Severe	43	19.6	1.6	40	80	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-
138	Severe	28	21.6	2.8	41	59	+	+	+	-	-	-	21	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
139	Moderate	40	28.7	5.0	35	67	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	Normal	37	17.4	35.2	70	60	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-
150	Normal	47	22.5	49.9	52	58	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	-	-	-	-	-
157	Moderate	36	29.0	8.5	29	65	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	-	-	-	-	-	-
158	Severe	31	19.7	ND	ND	ND	55	79	+	-	-	41	50	22	32	-	22	54	-	ND	23	-	49	-	ND	-	39	41
179	Severe	42	25.5	0.1	8	69	+	+	+	-	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	-	-	-	-
194	Normal	36	20.2	174.0	73	55	+	+	38	-	27	-	-	45	-	-	25	-	-	36	28	31	32	-	-	38	25	-
196	Moderate	39	21.6	9.0	63	45	+	+	+	-	-	-	-	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
201	Normal	35	33.2	49.4	39	62	+	+	+	-	-	-	39	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
209	Normal	33	27.6	72.7	69	51	+	+	+	-	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	-
211	Severe	50	31.6	1.9	16	73	+	+	+	-	-	-	-	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
213	Normal	25	19.2	22.8	67	53	+	+	+	-	-	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-
217	Normal	34	25.1	69.6	47	53	+	+	+	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
230	Normal	30	24.1	104.3	85	34	+	+	+	-	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
236	Normal	26	22.6	40.1	53	59	77	+	79	-	28	-	30	36	-	-	-	-	21	28	-	30	27	-	-	-	30	27

表 4 従来法との比較

	微量DNA 取扱	分子数の 定量	メチル化 比率測定	複数個所 同時測定	簡便性	コスト	ハイスルー プット
サザンブロット	×	×	○	△	×	×	×
シーケンス	○	×	○	○	×	×	×
COBRA	○	×	○	△	△	×	×
MSP	○	×	△	×	○	○	×
リアルタイムMSP	○	○	○	×	○	△	×
TaqMan	○	○	○	×	○	×	×
PCR-Luminex	○	×	○	○	○	○	○



## <略 記>

ART: Assisted reproductive technologies

AS: Angelman syndrome

bp: Base pair

BWS: Beckwith-Wiedemann syndrome

COBRA: Combined bisulphite PCRrestriction analysis

DMR: Differentially methylated region

ICSI: Intracytoplasmic sperm injection

IVF: In vitro fertilization

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

PGC: Primordial germ cell

## ＜図の説明＞

図 1 ヒトインプリントの遺伝子マップ

(A) 父由来インプリント DMR : (a) H19, (b) GTL2, (c) ZDBF2、(B) 母由来インプリント DMR : (d) DIRAS3, (e) NAP1L5, (f) FAM50B, (g) ZAC (PLAGL1), (h) GRB10, (i) PEG10, (j) PEG1 (MEST), (k) INPP5F-v2, (l) LIT1 (KCNQ1OT1), (m) RB1, (n) SNRPN, (o) ZNF597, (p) ZNF331, (q) PEG3, (r) PSIMCT-1, (s) NNAT, (t) L3MBTL, (u) NESPAS, (v) GNAS1A、(C) 非インプリント遺伝子反復配列 : (w) LINE1, (x) Alu の遺伝子マップ。括弧内は Genbank 登録番号、遺伝子の転写方向は黒枠の矢印で示す。白枠は各インプリント遺伝子の DMR を表す。横矢印 (→) はプライマーの位置を示す。垂直の線と数字は、CpG 部位を表す。縦矢印 (↑) は DNA 多型を示す。

図 2 H19 遺伝子 DMR のメチル化インプリントの解析

(A) COBRA 法 : PCR 産物は、メチル化されている場合のみ制限酵素 (TaqI) で切断される。切断された断片は図の右側 (+) に示した。Case A はメチル化されたバンドのみがみられ、正常と判定した。Case C の精子では非メチル化バンドもみられ、メチル化異常と判定した。

(B) シーケンス法 : H19 遺伝子 DMR の PCR 領域全ての CpG 部位についてメチル化の解析を行った。Case A は、すべてメチル化されていることを示す。Case C は、ほとんどメチル化されてなく異常と判定される。体細胞 (白血球) はコントロールとして示している。体細胞では、COBRA 法シーケンス法の結果、およそ 50% がメチル化されていない。つまり、この結果は PCR 反応で、バイアスがかかっていないことを示している。●はメチル化を、○は非メチル化を示す。

### 図3 メチル化インプリント異常の頻度と精子所見との関連性

- (A) メチル化異常の頻度と影響を受ける領域：全体でおよそ 25%にメチル化異常を認めた（左円グラフ）。精子型インプリント遺伝子の異常は 18%、卵子型インプリント遺伝子は 82%であった（右円グラフ）。
- (B) メチル化異常と精液所見との関連：精子のメチル化異常は精子濃度、運動率と負の相関を、奇形率とは正の相関を示す。縦軸は、メチル化異常の症例の頻度が占める割合（%）。横軸は、左グラフから、精子濃度（ $\times 10^6/\text{ml}$ ）、運動率（%）、奇形率（%）を3群に分けて示す。
- (C) メチル化インプリント異常の程度と精液濃度との関連：精子型インプリント遺伝子（左グラフ）；重症型乏精子症では、メチル化異常の程度も悪くなる傾向にある。卵子型インプリント遺伝子（右グラフ）；同じく、重症型乏精子症では、メチル化の程度が悪くなる傾向にある。

### 図4 同一患者内精子での精子濃度とメチル化の変動

同一患者内でのメチル化の変動：同一人の採取日が異なる精液について、それぞれメチル化の解析（精子型インプリント H19、卵子型インプリント PEG1）をおこなった。症例 X；H19 は濃度の改善に伴い正常値となる。（メチル化率 80%以上が正常）。症例 Y；PEG1 は、濃度の改善に伴い正常化している。（メチル化率 20%以下が正常）。精子濃度が高いほどメチル化の異常の程度は低くなる傾向が示された。縦軸はメチル化率（%）、横軸は精子濃度（ $\times 10^6/\text{ml}$ ）である。

## 図 5 PCR-Luminex 法と COBRA 法のメチル化率の比較検討

- (A) プラスミド DNA を用い PCR-Luminex 法によりメチル化率を測定し、回帰曲線検量線を作成した。ZDBF2 (図 1-A) を例とする。縦軸は PCR-Luminex 法による測定値、横軸はプラスミド DNA のメチル化率を示す。
- (B) PCR-Luminex 法と COBRA 法との比較：正常血液 (Blood1,2) と正常精子 (Sperm1,2) DNA を用いメチル化率を測定し比較した。両法による測定値は類似の値を示した。比較した値は、CpG サイトの 4 番である。
- (C) シーケンス法との比較：●はメチル化、○は非メチル化を示す。上に示す番号は CpG 部位の番号である。この場合、CpG 部位の 1 番と 4 番をそれぞれ比較した。両法の結果は類似した値を示している。

## 図 6 精子を用いた PCR-Luminex 法と COBRA 法の関連性

A) H19、B) GTL2、C) ZDBF2、D) ZAC、E) PEG1、F) LIT1、G) SNRPN、H) PEG3 についてメチル化異常を示す精子サンプルの値をプロットした。縦軸は Luminex 法により、横軸は COBRA 法により得た値を示す。異常を示す領域のメチル化 (父由来 DMR の場合 90%以下、母由来の DMR の場合 15%以上) は、GTL2 領域以外は強い相関を示した。

**表 1 Bisulphite PCR 解析で用いたプライマー配列**

それぞれのインプリント遺伝子 DMR について、プライマー配列、増幅長、アニーリング温度、制限酵素、Genbank 番号、染色体部位を示す。

**表 2 PCR-Luminex 法で用いたオリゴプローブの塩基配列**

それぞれのインプリント遺伝子 DMR のメチル化部位 (CpG 部位) に特異的なオリゴプローブ配列を示す。メチル化プローブは Me、非メチル化プローブは Un で示す。

**表 3 不妊症男性精子のメチル化異常**

解析をおこなった 197 例のうち、メチル化異常症例の一覧を示す。精子濃度を Severe (重症乏精子症)、Moderate (中等度乏精子症)、Normal (正常) に分けた。年齢、BMI、精液所見、各 DMR でのメチル化異常の有無を示す。数値はメチル化率である。＋は 80%以上を、－は 20%以下でそれぞれ正常範囲を表す。ND は測定不能。

**表 4 従来法との比較**

PCR-Luminex 法が、従来法と比較し、有用であることがわかる。

## ＜添付資料＞

疾患	総数	症例数	解析結果	ART 手技	報告者
	不明		LIT1 Hypomethylation(5/6)		
Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS)	65	6	H19 Hypomethylation(1/6)	IVF & ICSI	DeBaun et al. (2003)
	149	2	LIT1 Hypomethylation(2/2)	IVF & ICSI	Mahet et al. (2003)
	149	6	LIT1 Hypomethylation(6/6)	IVF & ICSI	Gicquel et al. (2003)
Angelman syndrome (AS)	不明	2	SNRPN Hypomethylation	ICSI	Cox et al. (2002)
	不明	1	SNRPN Hypomethylation	ICSI	Orstavik et al. (2003)
Silver-Russell syndrome (SRS)	60	2	H19 Hypomethylation PEG3 Hypomethylation	IVF & ICSI	Ogata et al. (2007)
Retinoblastoma (RB)	不明	5	RB Hypomethylation	IVF & ICSI	Moll et al. (2003)

図 1 ART 治療後の先天性インプリント異常症の報告例のまとめ

ART 治療としては IVF、ICSI が多い。また、メチル化異常を示す例が多いのが特徴と考えられる。

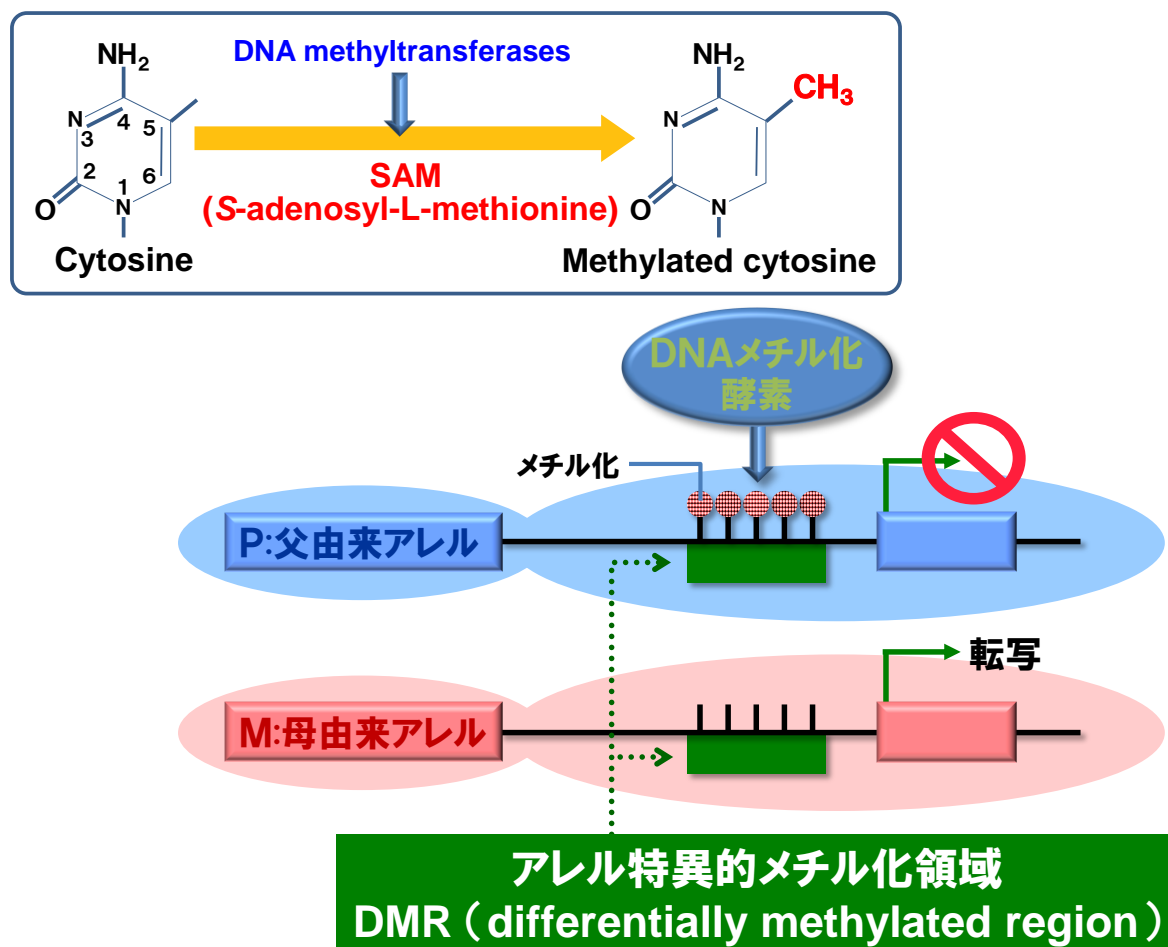


図2 インプリント遺伝子の DNA メチル化による発現調節

インプリント遺伝子には、父由来、母由来のアレルを区別するアレル特異的メチル化領域（DMR）が存在する。この DMR のメチル化は、精子あるいは卵子形成過程で受精前に確立し、片親性発現を調節する。

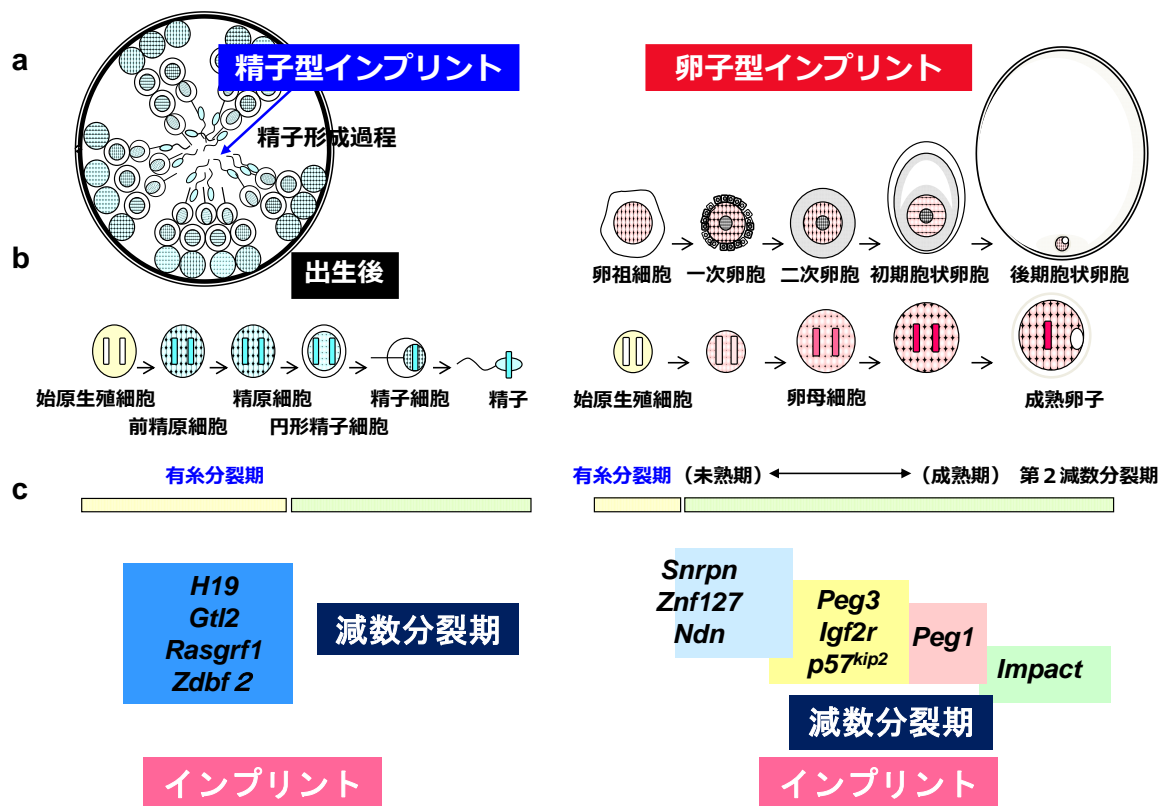


図3 生殖細胞成長過程における DNA メチル化の獲得

左図) 精子形成と精子型インプリントの確立

a: 精細管断面の模式図。b: 精子形成過程。c: 精子型インプリントの確立。有糸分裂期である前精原細胞（胎生 14.5 日目から出生時）でメチル化が確立する。

右図) 卵子形成と卵子型インプリントの確立

a: 卵胞形成過程。b: 卵子形成過程。c: 卵子型インプリントの確立。第一減数分裂の複糸期で、分裂がいったん停止して卵子が成熟する間に、段階的に遺伝子毎にメチル化が確立する。



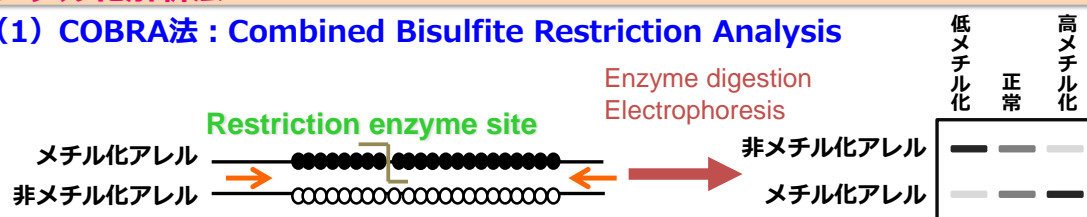
## 方法

### Bisulfite 法



### メチル化解析法

#### (1) COBRA 法 : Combined Bisulfite Restriction Analysis



#### (2) Bisulfite Sequencing

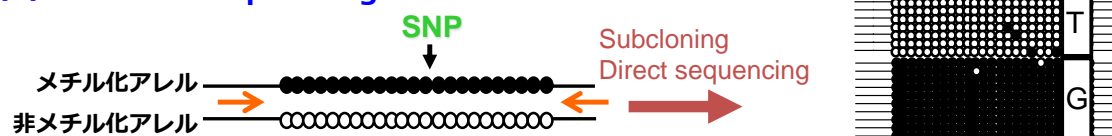


図 4 DNA メチル化の解析法

#### 1) Bisulfite 法

バイサルファイト処理により、メチル化していないシトシンは、ウラシルへ変換するのに対し、メチル化したシトシンは、メチルシトシンのまま残る。

#### 2) メチル化解析法

**COBRA 法** : COBRA 法では、メチル化しているテンプレート DNA (バイサルファイト処理済み) は、PCR 後に制限酵素を用いて切断できる。電気泳動により、メチル化バンドと非メチル化バンドを区別することができる。

**Bisulfite Sequencing** : PCR 産物は、pGEM-T ベクター (Promega) を用い、クローニング。各クローンは、M13 Reverse プライマーを用い、塩基配列を決定。1つのサンプルについて、約 20 クローンずつシーケンスした。また、PCR 領域内に DNA 多型を見つけ、アレル特異的にメチル化と非メチル化を識別した。

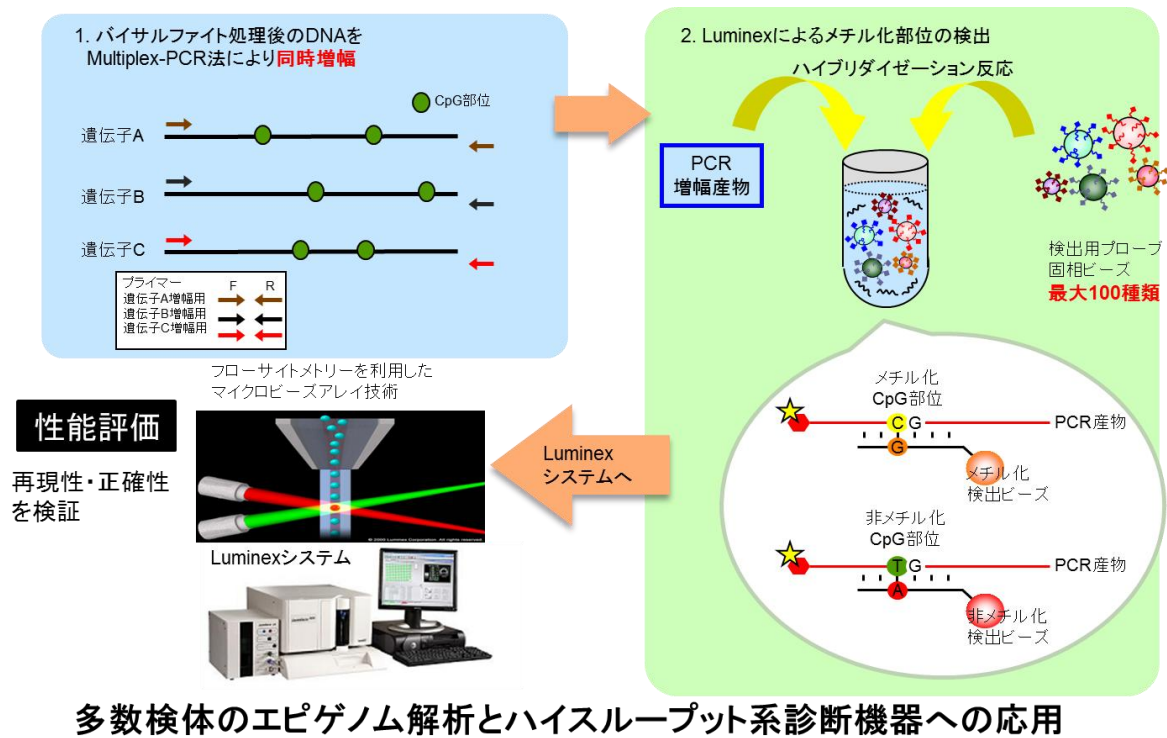


図 5 PCR-Luminex 法